中華農業研究（Jour. Agric. Res. China）47(4)：364～376（1998）

培養基組成與培養容器覆蓋物對康乃馨組織培養苗玻璃質化與發根的影響[1]

陳威臣[2]　蕭翌柱[2]　賴建洲[3]　蔡新聲[2]

摘要：玻璃質化(hyperhydricity, hyperhydration, vitrification or glassification)常見於草本與木本植物組織培養大量繁殖之過程，是種苗產業上相當嚴重的問題。傳統微體繁殖爲防止污染及培養基水分喪失，均以低透氣性的材質加以密封，是導致培養瓶苗玻璃質化的主要原因之一。"瓶內馴化"可有效控制玻璃質化，並增加瓶苗移出之存活率。本研究主要探討BA (N^6-benzyladenine) 濃度、MS鹽類強度、Auxin種類及藥包紙封口對康乃馨苗生長與發根的影響。結果顯示，利用含有0.5 mg/l BA的1/2 MS基礎培養基，配合透氣性較高的藥包紙封口，可大量繁殖生長良好且無玻璃質化的康乃馨瓶苗；藥包紙封口處理可將玻璃質化苗回復爲正常苗，亦可降低正常苗培養時玻璃質化發生的比率；單層藥包紙封口較有利於玻璃質化苗的回復與控制，但不利於繁殖率，而苗長在單、雙層藥包紙封口之處理間差異並不顯著；1 mg/l IBA (indole-3-butyric acid)對康乃馨瓶苗之發根效果最佳；單、雙層藥包紙封口處理對瓶苗發根之影響並不顯著。本研究結果顯示，利用適當的培養基組成並配合藥包紙封口的通氣處理方式，可有效抑制康乃馨瓶苗玻璃質化及改進瓶苗品質。

關鍵詞：康乃馨、組織培養、玻璃質化、培養容器覆蓋物、發根。

前　言

玻璃質化(hyperhydricity, hyperhydration, vitrification or glassification)常見於草本與木本植物之組織培養。玻璃質化苗具有玻璃狀透明外觀之莖與葉，常造成繁殖率降低及瓶苗移出馴化時的困難，導致較長時間與較大花費的馴化過程，造成商業生產上的嚴重損失。玻璃質化的成因是由於數種物理、化學因子或兩者共同作用所導致，影響的層次包括培植體形態、生理及生化的變化，是組織培養上相當嚴重的問題，因而玻璃質化的控制是組織培養大量繁殖過程中急需解決的問題[3, 8, 9, 10, 11, 23, 24, 25]。

早期的研究指出乙烯(ethylene)、銨基鹽類(NH_4^+)及其他離子(K^+、Ca^{++}與Cl^-)的含量、碳水化合物之種類及濃度、水分有效性、Cytokinins (如 N^6-benzyladenine)的濃度、培養基的物理狀態、凝膠物質的品牌與濃度、空氣及培養容器中的相對濕度、溫度、繼代培養之代數與間隔時間及品種等因子均會影響玻璃質化的形成，其中多篇報告均提供抑制玻璃質化的有效方法，由於影響因子極多，再加上受害的作物種類繁多，每種作物所需的條件均有不同，因此組織培養的玻璃質化始終無法獲得完善

---

1. 臺灣省農業試驗所　研究報告第1959號。
2. 本所農藝系助理、助理及研究員。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。
3. 本所農業工程系副研究員。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。

的控制。Paques (1987b, 1991)及 Ziv (1986, 1991)曾收集組織培養苗玻璃質化相關的報告，說明玻璃質化發生的原因、影響因子及控制的方法[9, 11, 23, 24]。

康乃馨又名香石竹，屬石竹科多年生(或宿根性)草本植物，其栽培以頂芽(或莖梢)扦插繁殖爲主，組織培養是康乃馨種苗生產之主要方式，玻璃質化普遍發生於組織培養大量繁殖之過程，康乃馨亦不例外。早期的報告指出多項影響康乃馨玻璃質化苗形成的因子及控制的方法[1, 2, 4, 6, 7, 8, 16, 18, 23, 24, 25, 26]。傳統微體繁殖爲防止污染及培養基水分喪失，均以低透氣性的材質加以密封，而許多學者認爲此方式會造成培養瓶內之高相對濕度、有毒氣體(如二氧化碳及乙烯)及致毒形式氧(toxic oxygen forms)的累積，往往導致氣孔及表皮蠟質層的發育異常或不具功能，常造成瓶外移植馴化的困難。近年來，越來越多的研究結果顯示，利用具有通氣性的培養容器覆蓋材質進行瓶內馴化，可有效地控制玻璃質化及增加瓶苗移出馴化的存活率，是一種值得嚐試的方法[3, 4, 5, 14, 15, 16, 20, 21, 22, 23, 24]。

本研究利用不同培養基組成，配合不同材質及數量的培養容器覆蓋物，探討康乃馨玻璃質化苗的發生與回復情形及對正常苗生長的影響，同時探討不同Auxin對康乃馨正常與玻璃質化苗發根的影響，以期能降低玻璃質化組織培養苗在商業生產上所造成的嚴重損失。

材料與方法

一、材料

本試驗所選用之材料係採自田間康乃馨(*Dianthus caryophllus* L. cv. Opale)植株上之生長點及腋芽接種於固體培養基，經數週培養成爲幼苗，並經數次繼代培養繁殖足量幼苗作爲試驗之材料(圖 1)。

圖 1. 康乃馨大量繁殖所產生的正常苗與玻璃質化苗

Fig. 1. The normal and vitrified plantlets produced in mass-propagation medium of carnation *in vitro* culture.
N：normal plantlets；V：vitrified plantlets

二、培養基成份、培養材料及處理方法

康乃馨芽體繼代培養基以MS (Murashige & Skoog, 1962) 為基本配方，其中鐵鹽及有機成份均維持全量，其餘無機成份則改為半量，再添加 0.5 mg/l BA (N^6-benzyladenine)、3 %蔗糖及 0.9 %洋菜(Difco agar)，pH 值調至 5.7± 0.1 (簡稱 CN 培養基)[1, 2]，以 121℃、1.05 kg / cm^2 (15 1b / in^2) 之高溫高壓殺菌後，放冷備用。

培養基成份之測試以上述 CN 培養基為主，依試驗項目之不同而改變其組成，其中BA 濃度以 0.5 及 5 mg/l 進行比較；MS 無機鹽類強度則以全量與半量 (1/2 MS)進行測試；培養容器覆蓋物之試驗分別以兩張鋁箔紙(一般用法)與 1 或 2 張之藥包紙(早期醫院或診所中用來包藥之紙張)進行研究，鋁箔紙與藥包紙的大小約為 110 cm^2；Auxin 種類及濃度則以 0.5 及 1 mg/l NAA (α-naphthaleneacetic acid)與 1 mg/l IBA (indole-3-butyric acid)進行比較，以上試驗主要探討康乃馨瓶苗之生長、玻璃質化苗的形成與回復及瓶苗發根的情形。

試驗用培養容器為 500 ml 三角瓶(俗稱蘭花瓶；瓶口內徑為 3.7 cm)，含 100 ml 培養基，其內接種 7 個(長約 1.0～1.5 公分)康乃馨小苗之莖梢或莖段，接種後置於 25±1℃之恆溫，以每日 16 小時照光(約 2,000 1ux)培養，培養 30 及 60 天後觀察記錄各處理之正常與玻璃質化苗的苗數、苗長及發根培植體數。玻璃質化苗之判別係以肉眼觀察，小苗或莖梢葉片呈現水浸透明狀為準。

上述各試驗觀察所得之數據，利用 SAS 統計程式軟體進行分析，取其平均值及樣品標準偏差，並以 Least Significant Difference (LSD) test 測定比較處理間之差異，以 Microsoft Excel 電腦程式繪出圖形。

結　　果

一、MS 鹽類強度、BA 濃度及培養容器覆蓋物對瓶苗生長之影響

表 1 顯示，在 0.5 mg/l BA 的處理條件下，基礎培養基為 MS 全量鹽類時，鋁箔紙封口處理產生玻璃質化苗，而藥包紙封口處理則無玻璃質化苗，所有苗數雖以鋁箔紙封口處理較多(2.51 vs. 2.20 苗/培植體)，但差異並不顯著；苗長超過 2.5 cm 之正常苗比率則以藥包紙封口處理之 67.9 %較高，而鋁箔紙封口處理僅 45.4 %；苗長以藥包紙封口處理為 4.97 cm，顯著較鋁箔紙封口處理之 3.89 cm 長。1/2 MS 鹽類之處理結果則與 MS 全量鹽類之處理結果相似(圖 2A、圖 2B)。表 1 的結果亦顯示，利用鋁箔紙封口時，MS 全量鹽類之處理雖然其所有苗數、正常苗比率及苗長方面與 1/2 MS 處理之差異均不大，但其玻璃質化苗比率(28.0 %)較 1/2 MS 的處理(3.4 %)高；在利用藥包紙封口的條件下，則 MS 全量與半量之處理其差異並不顯著。

表 1. MS 強度、BA 濃度與培養容器覆蓋物對康乃馨瓶苗生長的影響

Table 1. The influences of MS salts strength, BA concentration and vessel closure on proliferation of carnation shoot tip culture [z]

Treatment			Shoots per explant				Shoot length
BA (mg/l)	MS salts strength	Container closure (2 pieces)	Number (shoot≥1.0cm)	Normal (shoot≥1.0cm)	Normal (shoot≥1.0cm) %	Vitrified (shoot≥1.0cm) %	Normal (shoot≥2.5cm) cm
0.5	1	Aluminum foil	2.51 ay	72.0	45.6 b	28.0 b	3.89 b
0.5	1	Dispense paper	1.71 b	100.0	67.9 a	0.0 c	4.97 a
0.5	1/2	Aluminum foil	2.20 ab	96.0	36.7 b	3.4 c	4.01 b
0.5	1/2	Dispense paper	1.77 b	100.0	66.5 a	0.0 c	5.26 a
5	1/2	Aluminum foil	2.34 a	0.0	0.0 c	100.0 a	—
5	1/2	Dispense paper	2.03 ab	100.0	0.0 c	0.0 c	—
$LSD_{0.05}$			0.54		17.0	7.0	

[z] Culture medium：MS (or 1/2 MS) salts supplemented with 1 mg/l IBA, 3% sucrose, 0.9% agar and pH = 5.7. There were 5 replicates (7 explants per replicate) in each treatment and cultured for 60 days.

[y] Means with the same letter within each column are not significantly different at 5 % level by Least Significant Difference (LSD) test.

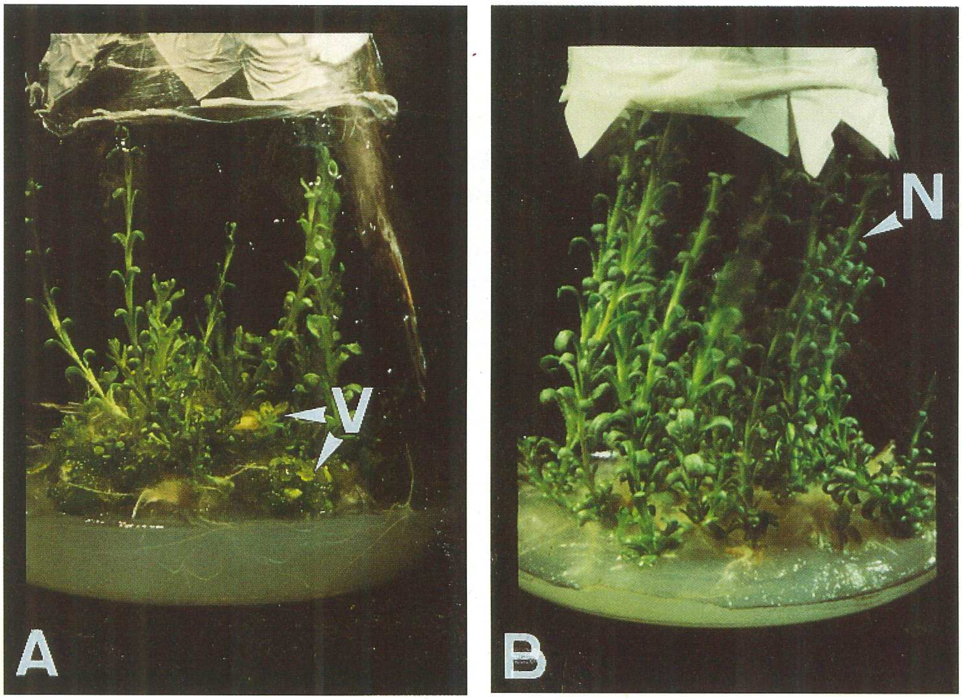

圖 2. 培養容器覆蓋物對康乃馨正常苗生長的影響

Fig. 2. The influence of vessel closure on proliferation of *in vitro* cultured carnation.

A：aluminum foil；B：dispense paper

N：normal plantlets；V：vitrified plantlets

在 1/2 MS 鹽類的條件下，比較 BA 濃度的處理差異可發現，5 mg/l BA 之處理可產生較多量的小苗，在鋁箔紙封口處理所形成的小苗其苗長大於 1.0 cm 爲 2.34 苗/培植體(大部分苗之苗長均小於 1.0 公分：資料未列)，但幾乎全爲玻璃質化苗，而藥包紙封口處理所形成的小苗其苗長大於 1.0 cm 爲 2.03 苗/培植體(大部分苗之苗長亦均小於 1.0 公分：資料未列)，雖較少於鋁箔紙封口處理，但差異並不顯著，且無玻璃質化苗產生；0.5 mg/l BA 與鋁箔紙封口處理組合上雖有玻璃質化發生，但比率較低僅 3.4 %，而 0.5 mg/l BA 與藥包紙封口處理組合則無玻璃質化發生。此外，在藥包紙封口處理的條件下，比較正常苗比率及苗長的結果發現，0.5 mg/l BA 與 5 mg/l BA 處理之苗長超過 2.5 cm 的正常苗比率，分別爲 66.5 及 0 %，且 0.5 mg/l BA 處理之苗長平均可達 5.26 cm，顯著大於 5 mg/l BA 之處理(1.27 cm：資料未列)。由此可知，添加 0.5 mg/l BA 之 1/2 MS 培養基，配合藥包紙封口處理可形成高品質的康乃馨瓶苗(圖 2B)，若以增殖做爲考量，則可利用較高濃度之 BA 誘導產生大量的小苗，但必須配合藥包紙封口，否則誘導出之苗可能均爲無用之玻璃質化苗。

二、藥包紙封口對玻璃質化苗回復及正常苗生長之影響

本試驗利用不同張數之藥包紙封口所造成培養容器通氣性的差異，探討玻璃質化苗回復爲正常苗及正常苗生長的影響。表 2 的結果顯示，就玻璃質化苗回復爲正常苗的情形來看，以莖梢作爲培植體時，雙層藥包紙封口的處理每個培植體可形成 2.41 苗，雖較單層藥包紙封口的處理(1.72 苗/培植體)產生較多的小苗，但正常苗比率則較低(33.7 vs. 47.9 %)，而在正常苗長的比較上，則以單層藥包紙封口之處理(2.10 cm)大於雙層之處理(1.73 cm)；若以莖段作爲培植體時，雙層藥包紙封口處理的苗數雖較單層藥包紙封口處理多，分別爲 2.83 與 1.98 苗/培植體，但正常苗比率則較低(30.1 與 42.1 %)，而在苗長的比較上，則單、雙層藥包紙封口處理間之差異並不顯著，分別爲 2.04 及 2.08 cm。由此可知，不論利用單、雙層藥包紙封口處理配合以莖梢或莖段作爲培植體，均可使玻璃質化苗回復成爲正常苗，其比率可達 30.1～47.9 % (表 2、圖 3A)。

表 2. 培植體來源與覆蓋容器之藥包紙張數對康乃馨瓶苗生長的影響

Table 2. The influences of normal and vitrified explant and piece of dispense paper as vessel culture on proliferation of carnation plantlets *in vitro* culture [z]

Treatment			Shoots per explant			Normal shoot length
Explant		Dispense paper	Number	Number (%)	Vitrified (%)	(cm)
Vitrified	Shoot tip	1 piece	1.72[cy]	47.9[a]	52.1[b]	2.10[a]
	Shoot tip	2 piece	2.41[b]	33.7[b]	66.3[a]	1.73[b]
	Nodal segment	1 piece	1.98[c]	42.1[ab]	57.9[ab]	2.04[a]
	Nodal segment	2 piece	2.83[a]	30.1[b]	69.9[a]	2.08[a]
$LSD_{0.05}$			0.28	13.0	13.0	
Normal	Shoot tip	1 piece	1.24[c]	97.0[a]	3.0[b]	4.14[a]
	Shoot tip	2 piece	1.83[b]	80.0[b]	20.0[a]	4.40[a]
	Nodal segment	1 piece	1.44[bc]	93.8[a]	6.2[b]	2.66[b]
	Nodal segment	2 piece	2.43[a]	69.9[b]	30.1[a]	2.27[b]
$LSD_{0.05}$			0.41	11.0		

[z] Basal medium：1/2 MS salts supplemented with 0.5 mg/l BA, 1 mg/l IBA, 3% sucrose, 0.9% agar and pH = 5.7. There were 9 replicates (7 explants per replicate) in each treatment. Developing shoots larger than 1.0 cm were recorded after 60 days of culture.

[y] Means with the same letter within each column are not significantly different at 5 % level by Least Significant Difference (LSD) test.

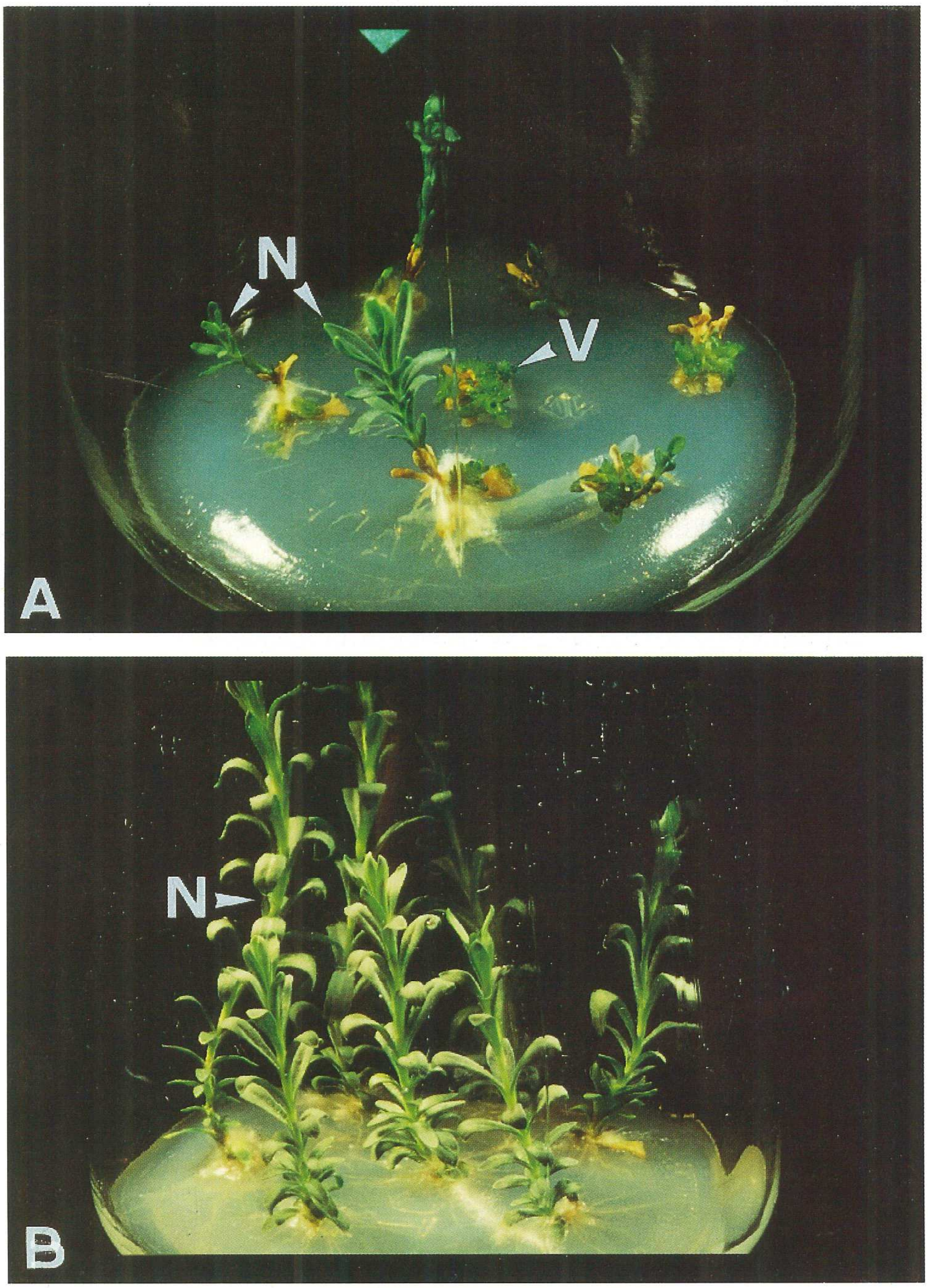

圖 3. 藥包紙對康乃馨正常苗生長與玻璃質化苗回復的影響

Fig. 3. The influence of dispense paper as vessel closure on recovery of vitrified plantlets and on growth of normal plantlets of carnation culture.

A：The normal plantlets were produced from vitrified shoot tip culture of carnation.

B：The normal plantlets were produced from normal shoot tip culture of carnation.

N：normal plantlets；V：vitrified plantlets

就正常苗生長的情形來看，表 2 的結果顯示，以莖梢作爲培植體時，雙層藥包紙封口處理爲 1.83 苗/培植體，雖較單層藥包紙封口處理(1.24 苗/培植體)產生較多的小苗，但也產生較高比率的玻璃質化苗(20.0 vs. 3.0 %)，正常苗長則分別爲 4.40 及 4.14 cm，並無顯著差異；若以莖段作爲培植體時，其結果的趨勢與莖梢培養相同。當覆蓋條件相同時，比較莖梢及莖段培養的差異時可發現，在單層藥包紙封口的條件下，雖然莖梢培養之苗數、正常苗及玻璃質化苗比率與莖段培養的差異均不顯著，但其正常苗長則顯著較長(4.14 vs. 2.66 cm)；而在雙層藥包紙封口的條件下，莖段培養所產生的苗數爲 2.43 苗/培植體，顯著大於莖梢培養的結果(1.83 苗/培植體)，而正常苗及玻璃質化苗比率則差異不顯著，正常苗長的比較上仍以莖梢培養大於莖段培養(4.40 vs. 2.27 cm) (表 2)。本研究結果顯示，在瓶苗育成上應以莖梢培養爲主要培植體(圖 3B)，若以增殖爲考量時則應以莖段培養爲主要培植體。

三、Auxin 及藥包紙封口處理對康乃馨正常及玻璃質化苗發根之影響

本試驗利用三種 Auxin 之處理，配合不同張數之藥包紙進行測試瓶苗之發根能力。圖 4 顯示接種 30 天後的結果，就發根培植體比率的結果而言，不論是正常苗或玻璃質化苗培養，單、雙層藥包紙封口之處理間均無顯著的差異。在正常苗培養時，1 mg/l IBA 處理的效果最佳，平均可達 81.0 %，而 0.5 與 1 mg/l NAA 之處理較差分別爲 71.4 與 61.4 %，其中 1 mg/l IBA 與 1 mg/l NAA 兩處理間具有顯著的差異，而 0.5 mg/l NAA 之處理與其餘兩處理間均無顯著的差異；若以玻璃質化苗做爲培植體，其發根的效果以 1 mg/l IBA 處理的效果平均爲 59.6 %最佳，顯著高於 0.5 mg/l NAA 處理的 18.6 %及 1 mg/l NAA 處理的 21.4 %。接種 60 天後的結果則顯示，在培養正常苗時，1 mg/l IBA 之處理平均發根率可達 97.6 %，0.5 mg/l NAA 之處理次之爲 92.9 %，而 1 mg/l NAA 之處理稍差爲 85.7 %，但三者間的差異並不顯著(圖 5)；若以玻璃質化苗做爲培植體，其發根的效果仍以 1 mg/l IBA 處理的 83.3 %效果最佳，顯著高於 0.5 mg/l NAA 處理的 76.1 %與 1 mg/l NAA 處理的 69.0 %，其中 1 mg/l IBA 與 1 mg/l NAA 兩處理間具有顯著的差異，而 0.5 mg/l NAA 之處理與其餘兩處理間均無顯著的差異。由此可見，正常苗之發根能力較玻璃質化苗佳；1 mg/l IBA 之處理對瓶苗的發根效果較 0.5 及 1 mg/l NAA 之處理好。

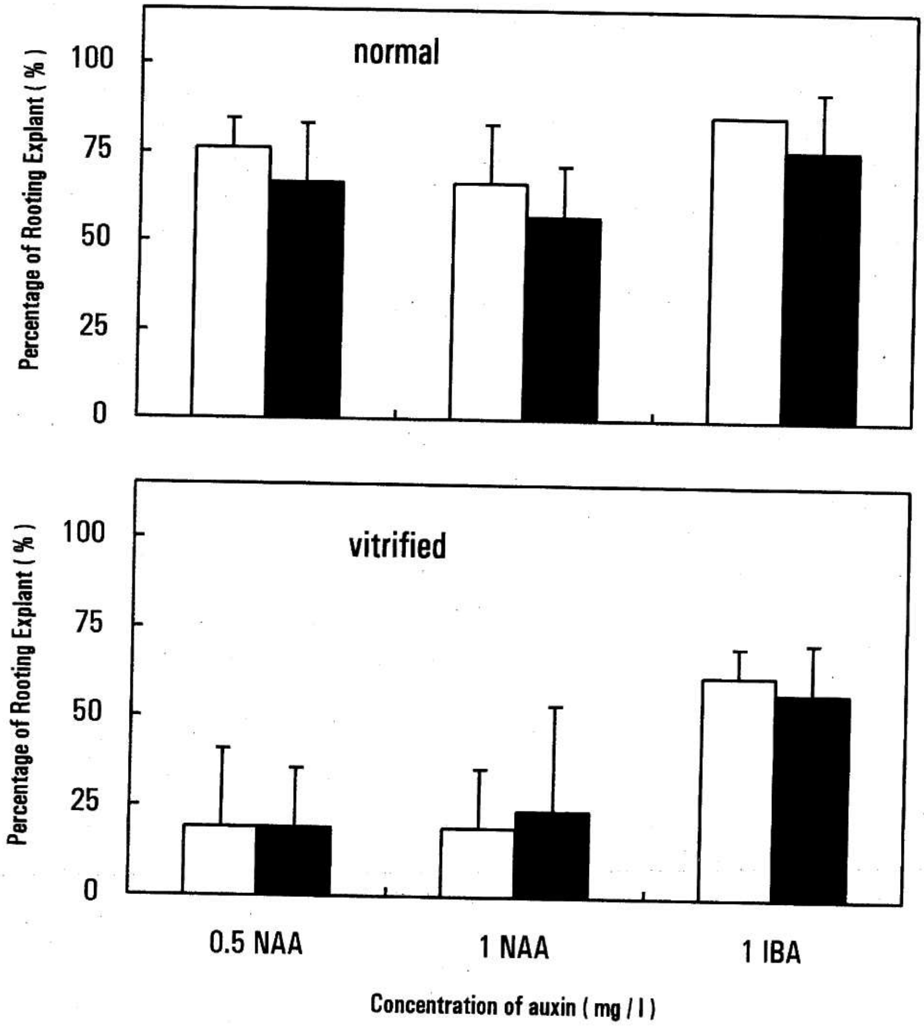

圖 4. Auxin 及藥包紙封口對康乃馨正常與玻璃質化苗發根的影響

□：單層藥包紙；■；雙層藥包紙；處理結果以平均值樣品標準偏差表示(3 重複，每重複 7 個培植體)。培養後 30 天調查發根之培植體數。

Fig. 4. The influence of auxin and dispense paper of the culture vessel on rooting of normal and vitrified shoot tip culture of carnation. Values was represented by mean±SE of 3 replicates (7 explants per replicate) per treatment. Data was recorded 30 days after culturing.

□：1 piece of dispense paper；■：2 pieces of dispense paper

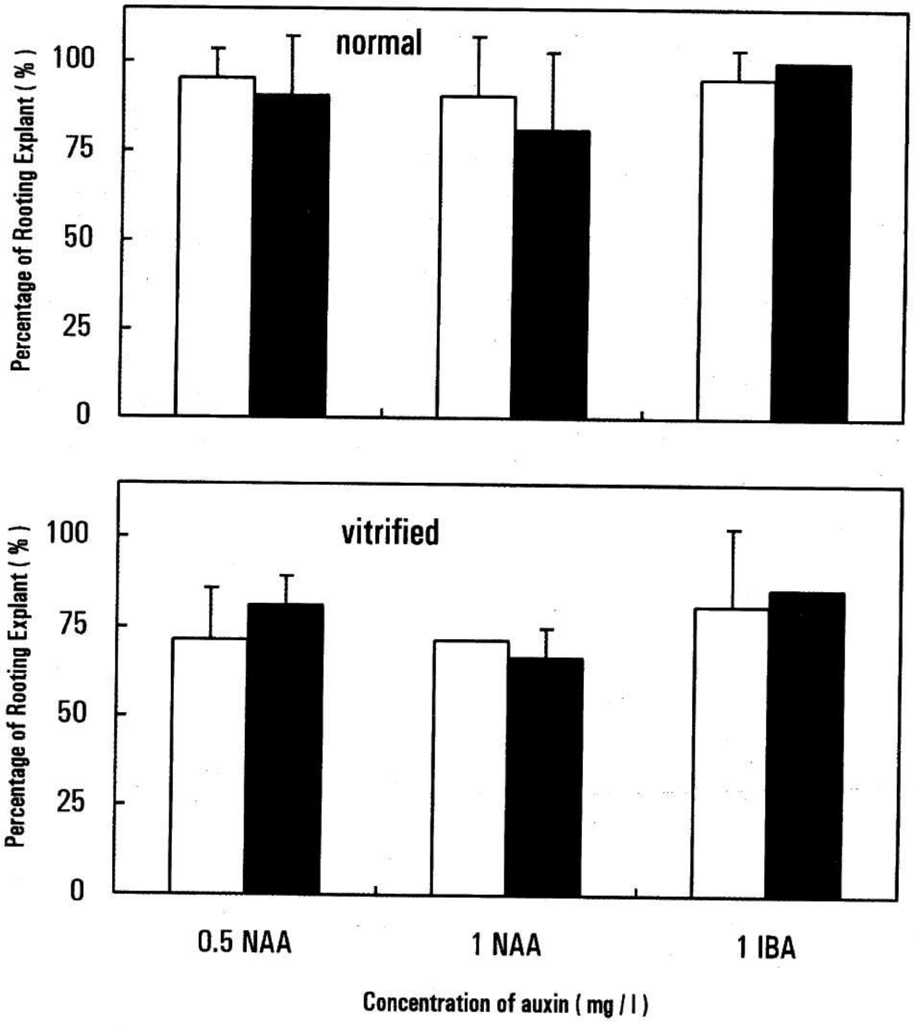

圖 5. Auxin 及藥包紙封口對康乃馨正常與玻璃質化苗發根的影響
□：單層藥包紙；■：雙層藥包紙；每處裡結果以平均值±樣品標準偏差表示(3 重複，每重複 7 個培植體)。培養後 60 天調查發根之培植體數。

Fig. 5. The influence of auxin and dispense paper of the culture vessel on rooting of normal and vitrified shoot tip culture of carnation. Values was represented by mean ±SE of 3 replicates (7 explants per replicate) per treatment. Data was recorded 60 days after culturing.
□ : 1 piece of dispense paper ; ■ : 2 pieces of dispense paper

討　論

組織培養大量繁殖是種苗商業生產上極爲重要的一環，爲求最大的繁殖倍率，生產者往往採用高濃度的 Cytokinins 或利用液體培養以達到目的，因而常常在培養過程中產生玻璃質化，導致瓶苗移出時馴化的困難與嚴重的損失。此外，爲防止污染及培養基水分喪失，利用低透氣性的材質(如鋁箔紙)加以密封，造成高相對濕度、有毒氣體(如 CO_2 及 C_2H_4)及致毒形式氧(toxic oxygen forms)的累積，往往導致氣孔及表皮蠟質層的發育異常或不具功能，亦是導致玻璃質化形成的因子之一[9, 11, 16, 23, 24]。

Leshem (1988)等學者指出，當其他的誘因如低濃度洋菜的培養基、高相對濕度及高濃度的 NH_4^+ 的條件下，若沒有 Cytokinins 的存在，玻璃質化並不會產生[8]。Phan (1991)、Paques (1987 a, 1987c)及古與蔡(1994 a)均指出，玻璃質化苗的比例隨著 BA 濃度的增高而增加，銨態氮比例的增加亦有增高玻璃質化的趨勢[1, 10, 12, 13, 21]。本研究比較 0.5 與 5 mg/l BA 及全量與半量 MS 之處理間的差異，獲得相似的結果(表 1)。Capellades (1990)指出，較低的相對濕度(75% RH)配合較高的光強度(80 μmole/s/m^2)能有效抑制玫瑰瓶苗之玻璃質化。Capellades 等學者認爲，增加光強度及降低濕度可產生如瓶外馴化的效果，更進一步證明利用"瓶內馴化(*in vitro* hardening)"可減少由瓶內移出過程中所造成的損失，並能縮短瓶外馴化的時間[3]。同樣地，許多報告的結果指出，利用高透氣性的培養容器覆蓋物或降低培養環境的相對濕度，均能有效的抑制組織培養苗之玻璃質化現象[4, 5, 14, 15, 19, 20, 21, 22, 23, 26]。本研究結果顯示，培養容器覆蓋物會影響玻璃質化的形成、苗數的多寡及苗長，此結果與上述報告之結果相似。利用含有 0.5 mg/l BA 之 1/2 MS 基礎培養基，若能配合透氣性較高之藥包紙覆蓋瓶口，可有效的控制康乃馨瓶苗之玻璃質化，並大量繁殖生長良好之康乃馨瓶苗(表 1、圖 2B、圖 3B)。

Sato (1993)指出，許多報告中所提供的方法均可影響玻璃質化苗的形成率，但是對於玻璃質化苗的回復則毫無影響；將康乃馨玻璃質化苗培養於含有 3 g/l Bacto-peptone 之培養基，可成功地使其葉表產生如正常苗般的表皮層蠟質而回復爲正常苗，且移植成功率可達 92 %[17]。Paques (1987c)指出，玻璃質化是可誘導且爲可逆的現象，藉由移植到不同培養基或培養環境下可回復爲正常苗，然而其培養基及環境則有不同的組成與條件[12]。大部分的報告只探討玻璃質化的控制，較少提及將玻璃質化苗回復爲正常苗的研究。本研究探討不同的培養容器覆蓋物對玻璃質化苗回復及正常苗生長的情形，結果顯示利用 CN 培養基並配合藥包紙封口的處理，可將玻璃質化苗回復爲正常苗，亦可降低正常苗培養時玻璃質化發生的比率；單層藥包紙封口具有較高的透氣性，對於玻璃質化苗的回復較有幫助，但會抑制正常瓶苗的增殖，而玻璃質化莖梢在雙層藥包紙封口的條件下回復情形較差，本研究與前述之研究也有相似的結果(表 2、圖 3A、圖 3B)。利用藥包紙做爲培養容器覆蓋物時，莖梢培養可形成健壯的瓶苗，而莖段培養則可形成大量的小苗，作者建議於康乃馨瓶苗之生產利用上，利用莖段培養配合藥包紙封口處理以進行增殖小苗，而後取其莖梢且配合藥包紙封口處理進行瓶苗育成的工作。

藉由控制培養基的水分潛勢、相對濕度、培養容器的覆蓋物、NH_4^+與 Ca^{++} 的含量、生長調節劑、抗蒸散劑(anti-transpirants)或抗玻璃質化劑(anti-vitrification agent) 等處理，均可降低玻璃質化的比率，然而所有的措施均會造成瓶苗品質及繁殖率的降低[12, 21, 23]。Dillen 與 Buysens (1989)指出，滿天星*(Gypsophila paniculata)*玻璃質化出現在組織培養的緩慢增殖期(lag phase)，而利用自製的通氣設備可抑制此時期發生玻璃質化，且後續的高相對濕度及低透氣性培養環境下，也不會產生玻璃質化；若全程採用此培養設備，雖可降低玻璃質化比率，但苗長則受影響而減少[5]。Rossetto (1992)指出，利用自製的培養容器覆蓋物以增加透氣性，可成功減少玻璃質化且不影響瓶苗的形成與生長，Reborts 在玫瑰與菊花的研究上，也獲致相似的結果[15]。Yue (1993)等學者指出，增加透氣及降低相對濕度，可促進天竺葵(geranium)的生長並降低蒸散作用率，而不影響光合作用率，作者更指出，此兩種處理有礙發根，宜在發根後再施以處理，以促進瓶苗的生長與馴化效果[22]。本研究結果指出，將莖梢培養於含有 0.5 mg/l

BA 之 1/2 MS 培養基的條件下，鋁箔紙封口處理之苗數雖大於藥包紙封口之處理，但差異並不顯著，而在正常苗長的比較上，則是以藥包紙封口之處理顯著較長(表 1)；單、雙層藥包紙封口處理對正常苗長之影響並不顯著，但在苗數上則有顯著的差異(表 2)；單、雙層藥包紙封口處理對正常或玻璃質化苗之發根均無顯著差異；此外，本研究發現藥包紙封口處理易使培養基的水分喪失，以致在培養 60 天後小苗不易由瓶內取出或根部糾結成團，造成操作上的困難，因此瓶內馴化階段的培養時間應加以控制。控制 MS 鹽類強度、BA 濃度及培養容器覆蓋物可有效抑制玻璃質化，而繁殖率的降低只出現在透氣性最大的單層藥包紙封口處理，但正常瓶苗的生長在藥包紙封口的處理下並未受抑制，反而有促進的效果；1 mg/l IBA 對瓶苗的發根效果最佳，而單、雙層藥包紙封口處理對瓶苗發根之影響並不顯著，但在考量瓶苗增殖及污染率(20.5 vs. 11.1 %：資料未列)的情況下，仍以採用雙層藥包紙封口爲宜。

組織培養苗移植到溫室環境下存活不易，其原因在於嚴重的玻璃質化苗，因而在馴化過程中必須花費較高的成本及較長的時間，導致種苗產業極大的損失。藉由控制培養基組成及培養條件可降低玻璃質化的比率，然而所有的措施均會造成瓶苗品質及產量的降低。瓶內馴化(acclimatized *in vitro*；*in vitro* hardening)主要在於降低瓶內的相對溼度及增加氣體的交換率，如此可增加葉表蠟質的形成及氣孔的功能，藉以避免瓶苗產生玻璃質化現象，並可增加瓶外馴化時之光合作用率及降低蒸散作用率，以利瓶苗在瓶外馴化時存活率的增加與減少瓶苗的損失[14, 19, 20, 21, 23]。本研究結果建議，康乃馨組織培養大量繁殖系統，利用控制培養基組成並配合藥包紙封口之處理方式，可有效抑制玻璃質化、促使玻璃質化苗回復及增加瓶苗的品質。瓶內馴化技術可減少組織培養苗商業生產上的損失，結合組織培養與環境控制技術以進行瓶內馴化是未來發展的課題，而如何控制玻璃質化且又不影響增殖效率亦是研究的重點之一。

引用文獻

1. 古新梅、蔡新聲。1994a。培養基組成分對康乃馨試管苗玻璃質化的影響。中華農業研究 43(1)：51-62。
2. 古新梅、蔡新聲。1994b。繼代培養對康乃馨試管苗玻璃質化的影響。中華農業研究 43(3)：308-319。
3. Capellades, M., R. Fontarnau., C. Carulla, and P. Debergh. 1990. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rose multiflora*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115 : 141-145.
4. Cassells, A. C., and C. Walsh. 1994. The influence of gas permeability of the culture lid on calcium uptake and stomatal function in *Dianthus* microplants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 37(2) : 171-178.
5. Dillen, W., and S. Buysens. 1989. A simple technique to overcome vitrification in *Gypsophila paniculata* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 19 : 181-188.
6. Huang, L. C., C. Kohashi, R. Vangundy, and T. Murashige. 1995. Effects of common components on hardness of culture media prepared with Gelrite. In Vitro Cell. Dev. Biol. 31 : 84-89.
7. Kever, C., and T. Gaspar. 1986. Vitrification of carnation *in vitro* : change in water content, extracellular space, air volume and ion levels. Physiol. Veg. 24(6) : 647-653.
8. Leshem, B., E. Werker, and P. D. Shalev. 1988. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. Ann. Bot. 62 (3) : 271-276
9. Paques, M. 1991. Vitrification and micropropagation : causes, remedies and prospects. Acta Horti. 289:283-290.
10. Paques, M., and Ph. Boxus. 1987a. Vitrification：a phenomenon related to tissue water content ? Acta Horti. 212 : 245-252.
11. Paques, M., and Ph. Boxus. 1987b. "Vitrification" ： review of literature. Acta Horti. 212 : 155-166.
12. Paques, M. Ph. Boxus, and M. Dulos. 1987c. Vitrification : an induceable and reversible phenomenon. Acta Horti. 212 : 253-258.
13. Phan, C. T. 1991. Vitreous state *in vitro* culture : ethylene versus cytokinin. Plant Cell Rep. 9 : 517-519.
14. Ritchie, G. A., K. C. Short, and M. R. Davey. 1991. *In vitro* acclimatization of chrysanthemum and sugar beet plantlets by treatment with paclobutrazol and exposure to reduced humidity. J. of Exp. Bot. 42(245) : 1557-1563.
15. Rossetto, M. 1993. "Aeration" control vitrification. Agricell Rep. 20(4) : 29.
16. Sankhla, D. 1994. Toxic oxygen accumulation and hyperhydricity. Agricell Rep. 23(2) : 11.

17. Sato, S., M. Hagimori, and S. Iwai. 1993. Recovering vitrified carnation *(Dianthus caryophyllus* L.*)* shoots using Bacto-peptone and its subfractions. Plant Cell Rep. 12 : 370-374.

18. Seung, H. W., and J. M. Park. 1993. Multiple shoot culture of *Dianthus caryophyllus* using mist culture system. Biotechnology Techniques 7(10) : 697-702.

19. Short, K. C., J. Warburton, and A. V. Roberts. 1987. *In vitro* hardening of cultured cauliflower and chrysanthemum plantlets to humidity. Acta Horti. 212 : 329-334.

20. Smith, E. F., A. V. Roberts, and J. Mottley. 1990. The preparation *in vitro* of chrysanthemum for transplantation to soil. 3. Improved resistance to desiccation conferred by reduced humidity. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 21 : 141-145.

21. Wardle, K., E. B. Dobbs, and K. C. Short. 1983. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 108 : 386-389.

22. Yue, D., A. Gosselin, and Y. Desjardins. 1993. Effects of forced ventilation at different relative humidities on growth, photosynthesis and transpiration of geranium plantlets *in vitro*. Can. J. Plant Sci. 73 : 249-256.

23. Ziv, M. 1986. *In vitro* hardening and acclimatization of tissue culture plants. pp. 187-196. In : Plant Tissue Culture and its Agriculture Applications. (Eds. by Withers, L. A. and P. G. Alderson.). Butterworths London.

24. Ziv, M. 1991. Vitrification : Morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. pp. 45-69. In : Micropropagation : Technology and Application. (Eds. by Debergh, P. C. and R. H. Zimmerman) Kluwer Academic Pub. Dordrecht.

25. Ziv, M., and T. Ariel. 1992. On the relation between vitrification and stomatal cell wall deformity in carnation leaves *in vitro*. Acta Horti. 314 : 121-129.

26. Ziv, M., G. Meir, and A. H. Halevy. 1983. Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plentlets *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2 : 55-65.

Effects of Medium Composition and Vessel Closure on The Hyperhydricity and Rooting of Carnation *In Vitro* Culture[1]

Uei-Chin Chen[2], Yih-Juh Shiau[2], Chien-Chou Lai[3]
and Hsin- Sheng Tsay[2]

Summary

Hyperhydricity (hyperhydration, vitrification or glassification) is a phenomena frequently found in micropropagation of herbaceous and woody plants and it causes serious problems for industrial production. A low-ventilation vessel closure such as aluminum foil is commonly used for preventing contamination and dehydration in plant tissue culture however it might be one of the major reasons for causing hyperhydricity. It is thought *in vitro* hardening is a good way to prevent hyperhydricity and to increase the survival rate in transplanting *plantlets* to the field. The effect of BA concentration, strength of MS salts, types of auxin and different vessel closures for improving *in vitro* hardening on growth and rooting of carnation were investigated in this study. The results indicated that the half strength MS salts supplemented 0.5 mg/l BA and used high ventilation dispense paper as the vessel closure produced the highest number of normal plantlets with good growth. Although using single layer dispense paper as vessel closure reduced hyperhydric rate and had a good recovery for hyperhydric explants, it also resulted in decreasing of proliferation rate. There were no significant effect by using one or two layers of dispense paper on growth of shoot length as well as rooting capability. IBA (1 mg/l) was better than NAA (0.5 and 1 mg/l) on root inducing effect. The results of this study presented that hyperhydricity of *in vitro* proliferation carnation could be prevented and improved the quantity and quality of plantlets furthermore using a suitable medium composition and culture vessel closure.

Key words：Carnation, Tissue culture, Hyperhydricity, Vessel closure, Rooting.

---

1. Contribution No. 1959 from Taiwan Agricultural Research Institute.
2. Respectively, Research Assistant, Research Assistant, and Senior Agronomist, Department of Agronomy, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Associate Researcher, Department of Agricultural Engineering, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.